

微芯片技术在农产品及食品真菌毒素快速检测中的应用

满燕, 梁刚, 李安, 靳欣欣, 潘立刚*

(北京市农林科学院, 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京), 农产品产地环境监测北京市重点实验室, 北京 100097)

摘要: 真菌毒素污染的农产品及食品会对人类及牲畜的健康产生严重威胁。目前, 真菌毒素的检测主要采用液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等传统检测方法。然而, 这些检测方法的样品前处理过程比较繁琐、费时, 并且在分析过程中还会消耗大量的有毒试剂。微芯片技术所需样品的消耗量少并且分析时间短, 可实现样品的集成化、微型化以及高通量检测。微芯片技术在真菌毒素检测中的应用, 弥补了上述传统检测方法的不足。本文主要综述了微芯片技术在农产品及食品真菌毒素快速检测中的应用研究进展。首先对农产品及食品中常见的真菌毒素及其毒性进行了简单介绍; 接着重点对微芯片技术在真菌毒素检测中的应用进行了详细论述; 最后对微芯片应用于真菌毒素检测的发展前景和挑战进行了展望。

关键词: 真菌毒素; 微芯片; 检测

Application of microchip in the detection of mycotoxins in agricultural and food products

MAN Yan, LIANG Gang, LI An, JIN Xin-Xin, PAN Li-Gang*

(Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Risk Assessment Laboratory for Agro-products(Beijing), Ministry of Agriculture China, Beijing Municipal Key Laboratory of Agriculture Environment Monitoring, Beijing 100097, China)

ABSTRACT: Mycotoxin contamination in agricultural and food products has threatened the health of human and animals. Conventional methods for the detection of mycotoxins primarily include the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). However, all these methods require extensive sample preparation procedures and are time consuming. Moreover, large amounts of hazardous reagents and solvents are often used during analysis. Microchip requires less sample consumption and short analysis time, and can realize the integration, miniaturization and high-throughput detection of samples. The application of microchip in the detection of mycotoxins can overcome the deficiency of the above traditional detection methods. This review focused

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2015M581020)、北京市优秀人才骨干项目(2016000020060G127)、北京市博士后科学基金项目、北京市农林科学院博士后基金项目

Fund: Supported by China Postdoctoral Science Foundation (2015M581020), the Project of Beijing Excellent Talents (2016000020060G127), Beijing Postdoctoral Research Foundation and the Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences Postdoctoral Science Foundation

***通讯作者:** 潘立刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: panlg@brcast.org.cn

***Corresponding author:** PAN Li-Gang, Ph.D, Professor, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Haidian District, Shuguang Garden Middle Road, No.9, Beijing 100097, China. E-mail: panlg@brcast.org.cn

on the application of microchip in detection of mycotoxins in agricultural products and food samples. The mycotoxins and their toxicity in agricultural products and food samples were firstly summarized. Then the application of microchip in detection of mycotoxins were reviewed in detail. Finally, challenges and future research directions in the development of microchip in detection of mycotoxins were previewed.

KEY WORDS: mycotoxin; microchip; detection

1 引言

真菌毒素是由真菌在适宜的环境条件下产生的有毒的次级代谢产物,并且普遍存在于农产品及食品中。真菌毒素通过污染的农产品及食品进入到食物链,将会对人类及牲畜造成致癌性、致畸性、致突变性等严重危害^[1]。因此,真菌毒素引起的食品安全问题越来越为人们所关注。目前,真菌毒素的检测主要采用液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)以及气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等传统检测方法。然而,这些检测方法的样品前处理过程比较繁琐、费时,并且在分析过程中还会消耗大量的有毒试剂。近年来,免疫分析作为一种强有力的生物分析工具被用于真菌毒素的检测,但是,样品中复杂基质会对免疫分析的灵敏性、重现性造成严重影响^[2]。因此,在免疫分析前通常需要对样品进行前处理,然而,这些复杂、费时、需要大量有机试剂的传统样品前处理方法在很大程度上限制了实时、便携式免疫技术的发展。微芯片技术已经被列入 21 世纪最重要的前沿技术行列,可以将制备、分离、反应、检测等生物或化学实验操作进行集成,降低样品的消耗量,缩短分析时间,提高检测灵敏度,最终实现样品的集成化、微型化、高通量及自动化检测。微芯片在真菌毒素检测中的应用,弥补了传统检测及免疫检测方法的不足,满足了农产品及食品安全领域所追求的实时、快速、便携式检测的需求^[3]。本文主要综述了微芯片技术在农产品及食品真菌毒素快速检测中的研究进展,对农产品及食品中常见的真菌毒素及其毒性进行了简单介绍,并重点对微芯片技术在真菌毒素检测中的应用进行了详细论述,最后对微芯片技术应用于真菌毒素检测的发展前景和挑战进行了展望。

2 真菌毒素及其毒性

目前已知 300 多种结构不同的真菌毒素,其中对农产品及食品污染最为严重、对人类危害较大的真菌毒素主要有黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)(主要包括黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 M₁(aflatoxin M₁, AFM₁)、赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)、链格孢毒素(主要包括链格孢酚(alternariol, AOH)、链格孢酚单甲醚(altenariol monomethyl ether, AME)、细交链孢菌酮酸

(tenuazonic acid, TeA))、脱氧雪腐镰刀菌烯醇,又被称为呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)、展青霉素(patulin, PTL)、T-2 毒素(T-2 toxin, T-2)、伏马毒素 B₁(fumonisin B₁, FB₁)、橘霉素(citrinin, CIT)等。AFs 占污染食品和饮料的真菌毒素的 93%,具有致癌性;研究表明 AFs 对雏鸭、老鼠和羊的 LD₅₀ 分别为 0.4 mg/kg、1 mg/kg 和 500 mg/kg^[4];AFs 被世界卫生组织(WHO)的国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)划定为 I 类致癌物,主要是对人及牲畜的肝脏具有极强的破坏作用;在发展中国家,尤其是在南非和撒哈拉以南非洲,AFs 的急性毒性可以导致毁灭性的疾病,如肝癌^[5];在农产品和食品中,AFB₁ 最为常见,并且其致癌性及毒性最强;AFM₁ 毒性略低于 AFB₁, 但仍是强致癌剂。OTA 主要具有肾毒性^[6],被认为与人类的巴尔干肾病(肾肿瘤)有关^[7],此外,还具有肝毒性、神经毒性、致畸性及致癌性^[8];IARC 将其定位 2B 类致癌物^[9]。AOH 和 AME 表现出较强的致突变性^[10],是拓扑异构酶 I 和 II 的抑制剂^[11],可导致 DNA 链的断裂^[12,13],具有致癌性^[14]。研究表明 AOH、AME 是引起我国林县食道癌高发生率的重要原因^[15];TeA 具有急性毒性作用,其毒性水平居链格孢毒素之首,并且还可能存在致癌性、细胞毒性,已经被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)列入有毒化学登记册中^[16-18]。DON 具有很强的细胞毒性,并能够干扰蛋白质合成^[19],摄入 DON 污染的食物后,会导致腹泻、呕吐、厌食、体重减轻、神经内分泌和免疫活性改变、白细胞增多、出血、休克甚至死亡^[20]。ZEA 是非类固醇类、雌激素性质的真菌毒素,主要作用于生殖系统,具有较强的生殖毒性和致畸作用等,与人的宫颈癌密切相关^[21]。PTL 能够损伤免疫系统^[22],具有基因毒性、诱变性、致癌性和细胞毒性^[23]。T-2 毒素能够抑制蛋白质、DNA 和 RNA 的合成,并且表现出免疫毒性和细胞毒性,对皮肤具有严重毒性等^[24],与人类食物中毒性白细胞缺乏病症、大骨节病和克山病密切相关^[25]。FB₁ 对马、猪和老鼠具有肝毒性、并具有致癌性,被 IARC 列为 2B 类致癌物^[26]。CIT 具有肾毒性、肝毒性、免疫毒性及致癌性等^[27]。因此,摄取这些真菌毒素污染的食品及农产品会对人体健康产生严重威胁,开发实时、快速、便携式的检测方法用于真菌毒素的检测技术迫在眉睫。

3 微芯片技术在真菌毒素检测中的应用

微芯片技术所需样品的消耗量少并且分析时间短,可实现样品的集成化、微型化以及高通量检测^[28]。当前,集成于微芯片的检测方法主要包括光学检测、电化学检测、光电化学检测以及免标记检测4种类型。

3.1 光学检测

3.1.1 荧光检测

荧光检测方法具有高的检测灵敏度,并且能够应用于微/纳米尺寸,已经广泛应用于真菌毒素的检测。Arévalo等^[29]等分别以荧光光度计和电化学方法为检测手段,利用搭建的微芯片装置定量检测大米样品中的CIT。研究结果表明:荧光检测方法得到的检测结果与电化学阻抗免疫传感器的检测结果相吻合,同时也证实了这2种检测方法用于大米样品中CIT检测的有效性。此外,Soares等^[30]制备了一个基于双水相萃取与免疫功能集成的微芯片,同时实现样品的萃取、浓缩及定量检测。整个微芯片包括2个串联的功能区域,第一个区域是双水相萃取区,实现样品基质的萃取与分析物的预浓缩;第二个区域是免疫定量荧光检测区域,实现样品的定量检测。作者利用此双水相萃取与免疫功能集成的微芯片传感器检测红酒中的OTA,得到OTA的最低检测限(limit of detection, LOD)为0.26 ng/mL。虽然这种荧光检测方法的检测灵敏度较高,但是这种荧光检测需要外部光源或是荧光标记的激发,检测装置光学元件的集成相对比较复杂。

在食品及农产品中广泛存在多种真菌毒素污染物,因此需要建立高通量、多通路的检测方法用于多个真菌毒素的同时检测。近年来,多个真菌毒素的检测已经引起了科学家们的广泛关注^[31]。如Wang等^[32,33]制备了一种蛋白质免疫芯片,并以荧光为检测手段,同时检测AFB₁、AFM₁、DON、OTA、T-2和ZEA 6种真菌毒素;另外还制备了一种可同时检测玉米和花生中的AFB₁、DON、T-2和ZEA 4种真菌毒素的悬浮芯片。另外,科学家们还研制了可同时检测农产品中OTA和FB₁ 2种真菌毒素的蛋白质芯片^[34]。

3.1.2 化学发光检测

化学发光检测不需要外部光源或是荧光标记的激发,能明显减少集成光学元件的复杂性,在一定程度上,比荧光检测装置更加简单、便携。Sauceda-Friebe等^[35]通过在OTA上修饰水溶性肽段,制备了一种OTA-肽段复合物,并且将此复合物共价固定于玻璃芯片上。利用制备的带有化学发光读数系统的全自动微阵列芯片装置,在12 min内实现了生咖啡萃取物中OTA的间接竞争性免疫检测,得到生咖啡中OTA的LOD为0.3 μg/L。该生物微芯片表面的OTA-肽段生物传感识别探针具有可再生性,至少可重复使用20次。这种微型化、自动化微芯片装置,大大增加了

物质之间的传递,缩短了分析时间。Wang等^[36]将AFB₁、OTA、ZEA 3种真菌毒素抗原固定于聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,根据间接竞争免疫原理,建立可同时检测3种真菌毒素的膜免疫芯片,得到了AFB₁、OTA、ZEA 3种真菌毒素的LOD分别为2.0、2.0、3.0 ng/mL,达到了我国对玉米中3种真菌毒素的限量标准。另外,Li等^[37]研制了可同时检测AFB₁、OTA、ZEA 3种真菌毒素的基于聚合物刷的微阵列免疫芯片,得到了AFB₁和OTA的LOD为4 pg/mL,ZEA的LOD为3 pg/mL。虽然化学发光检测具备高的检测灵敏度,但是这种光学检测易受光学路径的长度和分析样品的浑浊度的影响。

3.1.3 可视化检测

Ma等^[38]制备了一种基于AFB₁响应的水凝胶和距离可读出的微芯片,能够便携式、可视化、定量检测AFB₁。作者首先利用AFB₁适配体、与适配体互补的DNA短链(作为交联剂),合成了一种AFB₁响应的水凝胶,并且胶体金纳米颗粒(AuNPs)被装入水凝胶中。当样品中含有AFB₁时,AFB₁适配体与AFB₁结合,导致水凝胶的断裂和AuNPs的释放,这时上清液会由无色变为红色。为了达到更高的检测灵敏度,并且用于定量分析,作者将与AFB₁响应并装入铂纳米颗粒(PtNPs)的水凝胶与一个距离可读出的体积柱状图芯片(V-芯片)相结合。其检测原理为:当样品中存在AFB₁时,水凝胶断裂释放出PtNPs,PtNPs催化过氧化氢(H₂O₂)水解产生氧气,氧气的气压会推动V-芯片中的红墨水线条移动,通过读出距离确定AFB₁的定量关系。这种可视化检测方法被用于啤酒中AFB₁的检测,得到AFB₁的LOD为0.55 ng/mL。Liu等^[39]利用相同的方法制备了可视化检测OTA的装置,得到了OTA的LOD为0.51 ng/mL。这种结合有目标物响应水凝胶和距离可读数的V-芯片,提供了一种简单的POCT(point of care test)装置,可快速、便携式、高选择性、可视化的定量检测食品和饮料样本中的AFB₁、OTA真菌毒素。

3.2 电化学检测

电化学检测技术不受光学路径的长度以及分析样品浑浊度的影响,并且具备较高的兼容性和灵敏性。此外,与光学微阵列读数系统相比较,电化学微阵列读数系统更适用于多个分析物的同时检测。因此,电化学检测技术被广泛应用于微芯片装置。Piermarini等^[40]利用丝网印刷技术在电化学板上制备了96孔丝网印刷碳电极,并在电极上形成竞争性ELISA方法,同时检测多个玉米样本中的AFB₁。另外,Parker等^[41]制备了一种基于金微电极阵列的微芯片竞争性免疫传感器,检测牛奶中的AFM₁。作者利用辣根过氧化物酶、四甲基联苯胺/过氧化氢作为电化学检测体系,得到牛奶中AFM₁的检测限为8 ng/mL,动态检测范围为10~100 ng/L。与丝网印刷电极相比,该金微电极提供了一个稳定的循环伏安曲线,并且具有更高的检测灵敏

度。Olcer 等^[42]也制备了一种基于金电极微阵列的新型实时电化学免疫微分析装置,快速、高灵敏检测小麦中的 DON 毒素,得到 DON 的 LOD 为 6.25 ng/mL。

基于磁珠的易操控的免疫微芯片传感器也被广泛应用于真菌毒素的检测。Hervás 等^[43-45]在微芯片上集成了一个基于磁珠的竞争性免疫实验(ELISA),样品中的 ZEA 与 HRP-ZEA 竞争性结合 G 蛋白-磁珠上的单克隆抗体位点,通过电化学检测方法,在 30 min 内分别实现了婴幼儿食品、饲料样品中 ZEA 的定量检测。作者通过施加电场,实现微通道内不同方向的流体的简单操控,并且分别在微芯片 2 个通道中依次实现竞争性 ELISA 和酶促反应。这种基于磁珠的竞争性免疫微芯片技术也被应用于苹果中 OTA 的定量检测^[46]。这种电驱动方法能够操控微通道内的流体在不同方向上进行流动或停止,使整个微免疫传感器的操作更加简易、智能化。

3.3 光电化学检测

Novo 等^[47]在聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)芯片上搭建了一个间接竞争性 ELISA 实验,并且在微芯片上集成一个微加工的氢化非晶硅光电二极管,利用化学发光检测红酒和啤酒中 OTA。作者制备了一种双通道 U 型微芯片装置,同时分析 OTA 标准溶液和 OTA 污染的样本。这种微芯片结构能够降低检测误差,最终得到 OTA 的 LOD 为 28 ng/mL。Soares 等^[48]制备了一个可再生的微竞争性免疫传感器,同时在微芯片上集成光电传感器,实时、快速检测红酒中的 OTA,得到 OTA 的 LOD < 0.5 ng/mL。该 PDMS 微芯片通道及通道内固定的抗原分子可快速再生并至少可重复利用 8 次。

此外,基于核酸适配体的光电化学微芯片传感器也被用于真菌毒素的检测。在一定程度上,核酸适配体探针比抗体探针具有更明显的优势^[49,50]。Costantini 等^[51]制备了一种基于核酸适配体双夹心实验(apptamer-linked immobilized sorbent assay, ALISA)的多通道玻璃-PDMS 微芯片,利用电化学方法对 OTA 进行检测。其检测原理为:当样品中含有 OTA 时,OTA 则与两种适配体形成双夹心结构,进而产生化学发光信号;而带有非晶硅光电传感器的微芯片则将这种化学发光信号转换为电信号,电信号经加工即可定量检测样品中的 OTA。作者利用这种新型微芯片装置,实现了啤酒中 OTA 的加标检测,得到了 OTA 的 LOD 和定量检测限(LOQ)分别为 0.82 mg/L 和 2.5 mg/L。

光电化学微芯片传感检测方法也被应用于多个真菌毒素同时检测中。如 Soares 等^[52]制备了一个新型、简单、负压驱动的多通路免疫微装置,可同时检测 OTA、AFB₁ 和 DON 3 种真菌毒素。作者通过在微芯片的下方集成一个 25 μm×25 μm 的氢化非晶硅(a-Si:H)光电传感器微阵列对信号进行采集。这种光电化学微芯片传感器为多个真菌毒

素的连续、实时、快速检测提供了一种新方法。

3.4 免标记检测方法

3.4.1 质谱检测

微芯片免疫传感器结合质谱(mass spectrometry, MS)是一种用于真菌毒素分析的免标记方法。由于 MS 检测系统具有高的检测灵敏度,因此,MS 与微芯片传感器的结合使用可以得到更低的检测限。Liu 等^[53]将基于微芯片的 nano LC (chip-nano LC)与三重四级杆 MS(QqQ-MS)系统结合,定量检测花生及其制品中的 AFBs。作者将梯度洗脱和多反应监控应用于色谱分离和 MS 检测。在 chip-nanoLC/QqQ-MS 分析前,样本经溶剂萃取及免疫亲和 SPE 萃取,分离出目标物,并降低样本基质的干扰;最后得到 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 AFM₁ 的线性范围为 0.048~16 ng/g。Jiang 等^[54]制备了一个集成有电喷雾电离质谱(ESI-MS)的塑料微芯片免疫传感装置,用于检测 AFB₁。通过调节 AFB₁ 抗体和 AFB₁ 的摩尔结合比率,AFB₁ 在一个专一性的亲和区域被在线捕获和浓缩,然后通过 ESI-MS 直接定量检测。

3.4.2 表面等离子共振传感检测

表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)是一种实时生物传感器,它可以实时监控微芯片传感器表面的质量变化,可在不需要任何标记的情况下,监测分子之间的相互作用,其中包括抗体-抗原反应。SPR 微芯片传感技术具有简单、快速的清洗过程以及短的分析时间等优点,并且这种微芯片具有可重复利用性,是用于真菌毒素检测的另外一种重要的免标记方法^[55,56]。

基于抗体的 SPR 免疫传感检测。Edupaganti 等^[57]制备了一个可专一性识别 AFB₂ 的单链可变的抗体片段(scFv),并将其固定于 SPR 传感芯片,利用竞争性 ELISA 检测方法,得到 AFB₂ 的 IC₅₀ 值为 8 ng/mL, LOD 为 0.9 ng/mL。随后这个方法被成功应用于杏仁中 AFB₂ 的检测。DON 和雪腐镰刀菌醇(nivalenol, NIV)是小麦中主要的真菌毒素。Kadota 等^[58]制备了另外一种基于单克隆抗体的 SPR 免疫传感器,检测小麦中的 NIV 和 DON。在这个竞争性抑制实验中,NIV 和 DON 在 SPR 实验中的 IC₅₀ 值分别为 28.8 ng/mL 和 14.9 ng/mL,回收率为 91.5%~107%,NIV 和 DON 的 LODs 分别为 0.1 mg/kg 和 0.05 mg/kg。SRP 分析得到的结果与传统的 LC-MS/MS 方法得到的结果相一致,这就表明 SPR 方法可以作为一种小麦中的 NIV 和 DON 毒素的快速检测方法。对于多个真菌毒素的检测,Mencely 等^[59]利用 SPR 免疫传感芯片连续检测谷物及其制品中的 T-2/HT-2 毒素的总和以及 DON 毒素,得到小麦、早餐谷物食品以及婴儿玉米食品中 DON 和 HT-2 的 LOD 分别为 12、1、29 μg/kg 和 31、47、36 μg/kg。Dorokhin 等^[60]制备了一个基于 iSPR 的多通路微阵列免疫传感器,连续定量检测 DON 和 ZEA,得到玉米和小麦中 DON 的 LOD 分别为 84 μg/kg 和 64

$\mu\text{g}/\text{kg}$, ZEA 的 LOD 分别为 $68 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。此外, Mak 等^[61]制备了一个基于磁纳米标签(magnetic nanotags, MNTs)的新型多通路微芯片 SRP 免疫传感检测平台, 连续检测 AFB₁、ZEA、HT-2 3 种毒素。这种磁纳米标签可以利用巨磁阻(giant magneto resistive, GMR)传感器, 如自旋阀传感器来检测, 最后得到 3 种真菌毒素的 LOD 为 $50 \text{ pg}/\text{mL}$ 。

基于核酸适配体的 SPR 传感检测。Zhu 等^[62]制备了一个基于核酸适配体的 SPR 微芯片生物传感器, 定量检测红酒和花生油中的 OTA。链霉亲和素作为交联蛋白固定于传感芯片的表面, 生物素修饰的核酸适配体通过链霉亲和素-生物素之间的相互作用被捕获。最后得到 OTA 的线性范围为 $0.094\sim 100 \text{ ng}/\text{mL}$, LOD 为 $0.005 \text{ ng}/\text{mL}$ 。

基于分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)的 SPR 传感检测。MIP 具有高的选择性和广泛实用性, 已经被广泛应用于真菌毒素的检测^[63,64]。Choi 等^[65]制备了一种基于 MIP 的 SPR 传感器检测 DON。在 DON 模板分子存在的情况下, 通过电聚合作用将吡咯在裸 Au 芯片上形成一个均匀的厚度为 5 nm 的分子印迹聚吡咯(MIPPy)膜。通过 MIPPy-SPR 传感器得到 DON 的线性检测范围为 $0.1\sim 100 \text{ ng}/\text{mL}$, LOD $>1 \text{ ng}/\text{mL}$ 。结果表明基于人工合成 MIPPy 膜的 SPR 传感器可以被用于检测 DON。Gupta 等^[66]将 3-氨基苯硼酸(3-APBA)和 T-2 毒素通过原位电聚合作用在 SPR 芯片上形成 π 共轭的具有纳米构型的 MIP, 得到 T-2 的 LOD 为 $0.05 \text{ pg}/\text{mL}$ 。

3.4.3 表面增强拉曼光谱传感检测

表面增强拉曼光谱技术(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)作为另外一种免标记和无损检测工具, 也被应用于食品及农产品中真菌毒素等有害化学物质的检测^[67,68]。Galarreta 等^[69]利用电子束光刻技术, 在玻璃盖片表面制备了一个金纳米结构, 并将此构建的 SERS 平台嵌入到 PDMS 微芯片通道中检测 OTA 污染物。作者采用 OTA 的核酸适配体作为捕获探针, 并将其固定于 2D 金纳米结构; SERS 用于感应核酸适配体寡核苷酸序列与 OTA 在结合前和结合后, 核酸适配体寡核苷酸序列构型的改变, 进而对 OTA 进行分析检测。

4 挑战与展望

微芯片技术是一种集成微/纳技术、物理、化学、工程等学科的交叉技术, 到目前为止, 还没有被广泛应用于食品及农产品中真菌毒素的检测。微芯片技术的研发依旧存在众多挑战, 国内外学者需要付出更多的努力研制更多新型微芯片分析装置用于真菌毒素的检测。与传统的检测方法相比, 微芯片技术的一个最重要的优点就是微芯片具有高的比表面积, 能够缩短基质的扩散距离, 提高检测灵敏度, 缩短分析时间。

食品基质的复杂性是当前研发新型微芯片检测技术

的最大挑战之一^[70]; 其次, 由于真菌毒素在食品及农产品中的随机分布性, 以及多种不同类型的真菌毒素的共存性, 检测的准确性也是当前面临的重大挑战; 另外, 微型化微芯片系统易被小颗粒物质或气泡阻塞。因此, 适当的样品前处理对于目标物的准确检测以及降低误差是非常必要的^[71]。目前几乎所有的用于真菌毒素检测的微芯片装置的样品前处理过程都是在微芯片外进行的, 所以下一步要致力于研究微芯片上样品的前处理。此外, 微芯片微通道表面张力、静电作用力等特性会对微芯片的检测限造成很大影响, 这是由于分析物分子在到达微芯片检测区域前, 可能会被吸附到微芯片内壁上^[72]。解决方法主要有采用无吸附性能的新型材料制备微芯片, 或是对内壁进行物理吸附涂层(如蛋白质涂层)或化学键合涂层, 在分析检测前对内壁上的吸附位点进行封闭。将其他分离方法、检测技术集成到微芯片分析装置依旧是未来的一个重点研究方向。基于纸的免疫传感器以及可再生的微芯片免疫传感器也必将是未来检测真菌毒素的发展趋势^[73,74]。在此基础上, 进一步研发能够同时检测多种真菌毒素的微型化、便携式的微芯片分析方法是下一步的研究计划。

参考文献

- [1] Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection [J]. *Curr Opin Biotech*, 2016, 37: 120–126.
- [2] Dzuman Z, Vaclavikova M, Polisenka I, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay in analysis of deoxynivalenol: investigation of the impact of sample matrix on results accuracy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(2): 505–514.
- [3] Zhang Z, Yu L, Xu L, *et al.* Biotoxin sensing in food and environment via microchip [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(11): 1547–1559.
- [4] Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. *Toxicology*, 2001, 167(2): 101–134.
- [5] Gong YY, Watson S, Routledge MN. Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies [J]. *Food Saf*, 2016, 4(1): 14–27.
- [6] Limonciel A, Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity [J]. *Toxins*, 2014, 6(1): 371–379.
- [7] Castegnaro M, Canadas D, Vrabcheva T, *et al.* Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(6): 519–529.
- [8] El KA, Atoui A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status [J]. *Toxins*, 2010, 2(4): 461–493.
- [9] Meulenberg EP. Immunochemical methods for ochratoxin A detection: a review [J]. *Toxins*, 2012, 4(4): 244–266.
- [10] Brugger EM, Wagner J, Schumacher DM, *et al.* Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 164(3): 221–230.
- [11] Fehr M, Pahlke G, Fritz J, *et al.* Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(4): 441–451.

- [12] Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro* [J]. *Mycotoxin Res*, 2007, 23(3): 152–157.
- [13] Fleck SC, Sauter F, Pfeiffer E, *et al.* DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016, 798–799: 27–34.
- [14] Lee HB, Patriarca A, Magan N. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology [J]. *Mycobiology*, 2015, 43(2): 93–106.
- [15] Liu G, Qian Y, Zhang P, *et al.* Etiological role of *alternaria* alternata in human esophageal cancer [J]. *Chin Med J Peking*, 1992, 105(5): 394–400.
- [16] Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs [J]. *World Mycotoxin J*, 2008, 1(2): 175–188.
- [17] Man Y, Liang G, Li A, *et al.* Analytical methods for the determination of *alternaria* mycotoxins [J]. *Chromatographia*, 2017, 80(1): 9–22.
- [18] 满燕, 梁刚, 李安, 等. 链格孢霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 453–458.
Man Y, Liang G, Li A, *et al.* Research progress of detecting methods for *alternaria* toxins [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(2): 453–458.
- [19] Broekaert N, Devreese M, Demeyere K, *et al.* Comparative *in vitro* cytotoxicity of modified deoxynivalenol on porcine intestinal epithelial cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 95: 103–109.
- [20] Bonnet M, Roux J, Mounien L, *et al.* Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target [J]. *Toxins*, 2012, 4(11): 1120.
- [21] Shim WB, Eremin SA. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin A and zearalenone [J]. *J Microbiol Biotechn*, 2009, 19(1): 83–92.
- [22] Nielsen K F. Mycotoxin production by indoor molds [J]. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39(2): 103–117.
- [23] Pennacchio A, Ruggiero G, Staiano M, *et al.* A surface plasmon resonance based biochip for the detection of patulin toxin [J]. *Opt Mater*, 2014, 36(10): 1670–1675.
- [24] Visconti A, Lattanzio VM, Pascale M, *et al.* Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1075(1–2): 151–158.
- [25] 张薇. 抗 T-2 毒素单链抗体的制备及该毒素对细胞毒性影响的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
Zhang W. Production of single chain antibody variable fragment (scFv) against T-2 toxin and the study on the cytotoxic effects of T-2 toxin on cells [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010.
- [26] Anfossi L, Calderara M, Baggiani C, *et al.* Development and application of a quantitative lateral flow immunoassay for fumonisins in maize [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 682(1–2): 104–109.
- [27] Xu Y, Xiong L, Li Y, *et al.* Citrinin detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry [J]. *Food Chem*, 2015, 177: 97–101.
- [28] 满燕, 梁刚, 靳欣欣, 等. 生物传感技术在食品农药残留检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3431–3441.
Man Y, Liang G, Jin XX, *et al.* Application of biosensor techniques in pesticides detection in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(9): 3431–3441.
- [29] Arévalo FJ, Granero AM, Fernández H, *et al.* Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor [J]. *Talanta*, 2011, 83(3): 966–973.
- [30] Soares RR, Novo P, Azevedo AM, *et al.* On-chip sample preparation and analyte quantification using a microfluidic aqueous two-phase extraction coupled with an immunoassay [J]. *Lab Chip*, 2014, 14(21): 4284–4294.
- [31] Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, *et al.* Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014) [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 901: 12–33.
- [32] 王莹. 同时检测多种真菌毒素的生物芯片技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Wang Y. Study on biochip technology for simultaneous detection of multiplex mycotoxins [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [33] Wang Y, Liu N, Ning B, *et al.* Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immuno chip [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 34(1): 44–50.
- [34] 王希春. 农产品中两种真菌毒素蛋白质芯片检测技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
Wang X. Detection of two kinds of mycotoxins in agricultural products by protein microarray [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [35] Saucedo FJ, Karsunke XY, Vazac S, *et al.* Regenerable immuno-biochip for screening ochratoxin A in green coffee extract using an automated microarray chip reader with chemiluminescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 689(2): 234–242.
- [36] 王丹. 建立同时检测三种真菌毒素膜免疫芯片方法的研究与抗庆大霉素多克隆抗体的制备[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
Wang D. Study on establishing simultaneous detection for three kinds of mycotoxin by membrane immune-chip and preparation of anti-GM polyclonal antibodies [D]. Nanchang: Nanchang University, 2010.
- [37] 李鑫. 基于免疫分析的农产品真菌毒素混合污染同步检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
Li X. Immunoanalysis based simultaneous detection of mycotoxins composite contamination in agro-products [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [38] Ma Y, Mao Y, Huang D, *et al.* Portable visual quantitative detection of aflatoxin B₁ using a target-responsive hydrogel and a distance-readout microfluidic chip [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(16): 3097–3104.
- [39] Liu R, Huang Y, Ma Y, *et al.* Design and synthesis of target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel for visual quantitative detection of Ochratoxin A [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2015, 7(12): 6982–6990.
- [40] Piermarini S, Micheli L, Ammida NH, *et al.* Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B₁ detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(7): 1434–1440.
- [41] Parker CO, Lanyon YH, Manning M, *et al.* Electrochemical immunochip sensor for aflatoxin M₁ detection [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(13): 5291–5298.
- [42] Olcer Z, Esen E, Muhammad T, *et al.* Fast and sensitive detection of mycotoxins in wheat using microfluidics based real-time electrochemical profiling [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 62: 163–169.
- [43] Hervas M, Lopez MA, Escarpa A. Integrated electrokinetic magnetic bead-based electrochemical immunoassay on microfluidic chips for reliable control of permitted levels of zearalenone in infant foods [J]. *Analyst*, 2011, 136(10): 2131–2138.

- [44] Hervas M, Lopez MA, Escarpa A. Electrochemical microfluidic chips coupled to magnetic bead-based ELISA to control allowable levels of zearalenone in baby foods using simplified calibration [J]. *Analyst*, 2009, 134(12): 2405–2411.
- [45] Panini NV, Salinas E, Messina GA, *et al.* Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of zearalenone in feedstuffs samples [J]. *Food Chem*, 2011, 125(2): 791–796.
- [46] FernandezBM, Bertolino FA, Fernandez G, *et al.* Determination of ochratoxin A in apples contaminated with aspergillus ochraceus by using a microfluidic competitive immunosensor with magnetic nanoparticles [J]. *Analyst*, 2011, 136(13): 2756–2762.
- [47] Novo P, Moulas G, Prazeres DM, *et al.* Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2013, 176: 232–240.
- [48] Soares RR, Ramadas D, Chu V, *et al.* An ultrarapid and regenerable microfluidic immunoassay coupled with integrated photosensors for point-of-use detection of ochratoxin A [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 235: 554–562.
- [49] AmayaGS, Delossantosalvarez N, MirandaOA, *et al.* Aptamer-based analysis: a promising alternative for food safety control [J]. *Sensors*, 2013, 13(12): 16292–16311.
- [50] 卢军利, 葛玮东, 孙建霞, 等. 核酸适配体技术在食品有害物检测中的研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2015, (2): 151–158.
Lu JL, Ge WD, Sun JX, *et al.* Research progress of aptamer in detecting harmful substances in food [J]. *J Agric Sci Technol*, 2015, (2): 151–158.
- [51] Costantini F, Sberna C, Petrucci G, *et al.* Aptamer-based sandwich assay for on chip detection of Ochratoxin A by an array of amorphous silicon photosensors [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 230: 31–39.
- [52] Soares R R, Santos D R, Chu V, *et al.* A point-of-use microfluidic device with integrated photodetector array for immunoassay multiplexing: Detection of a panel of mycotoxins in multiple samples [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 823–831.
- [53] Liu HY, Lin SL, Chan SA, *et al.* Microfluidic chip-based nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry for quantification of aflatoxins in peanut products [J]. *Talanta*, 2013, 113: 76–81.
- [54] Jiang Y, Wang PC, Locascio LE, *et al.* Integrated plastic microfluidic devices with ESI-MS for drug screening and residue analysis [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(9): 2048–2053.
- [55] Joshi S, Segarra FA, Peters J, *et al.* Multiplex surface plasmon resonance biosensing and its transferability towards imaging nanoplasmonics for detection of mycotoxins in barley [J]. *Analyst*, 2016, 141(4): 1307–1318.
- [56] Joshi S, Annida RM, Zuilhof H, *et al.* Analysis of mycotoxins in beer using a portable nanostructured imaging surface plasmon resonance biosensor [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(43): 8263–8271.
- [57] Edupuganti SR, Edupuganti OP, O’Kennedy R. Biological and synthetic binders for immunoassay and sensor-based detection: generation and characterisation of an anti-AFB2 single-chain variable fragment (scFv) [J]. *World Mycotoxin J*, 2013, 6(3): 273–280.
- [58] Kadota T, Takezawa Y, Hirano S, *et al.* Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 673(2): 173–178.
- [59] Meneely JP, Quinn JG, Flood EM, *et al.* Simultaneous screening for T-2/HT-2 and deoxynivalenol in cereals using a surface plasmon resonance immunoassay [J]. *World Mycotoxin J*, 2012, 5(2): 117–126.
- [60] Dorokhin D, Haasnoot W, Franssen MC, *et al.* Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(9): 3005.
- [61] Mak AC, Osterfeld SJ, Yu H, *et al.* Sensitive giant magnetoresistive-based immunoassay for multiplex mycotoxin detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(7): 1635–1639.
- [62] Zhu Z, Feng M, Zuo L, *et al.* An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in wine and peanut oil [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 65: 320–326.
- [63] Abou-Hany RA, Urraca JL, Descalzo AB, *et al.* Tailoring molecularly imprinted polymer beads for alternariol recognition and analysis by a screening with mycotoxin surrogates [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1425: 231–239.
- [64] 何庆华, 许杨. 分子印迹技术在真菌毒素检测中的应用[J]. *食品科学*, 2009, (11): 273–275.
He QH, Xu Y. Application of molecular imprinting technique in determination of mycotoxin [J]. *Food Sci*, 2009, (11): 273–275.
- [65] Choi SW, Chang HJ, Lee N, *et al.* A surface plasmon resonance sensor for the detection of deoxynivalenol using a molecularly imprinted polymer [J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2011, 11(9): 8654–8664.
- [66] Gupta G, Bhaskar AS, Tripathi BK, *et al.* Supersensitive detection of T-2 toxin by the in situ synthesized π -conjugated molecularly imprinted nanopatterns. An in situ investigation by surface plasmon resonance combined with electrochemistry [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(5): 2534–2540.
- [67] 袁景. 基于表面增强拉曼光谱的真菌毒素和农药残留的检测及其应用[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
Yuan J. The detection of mycotoxin and pesticide residue based on the surface enhanced Raman spectroscopy [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [68] Lee KM, Herrman TJ, Bisrat Y, *et al.* Feasibility of surface-enhanced raman spectroscopy for rapid detection of aflatoxins in maize [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(19): 4466–4474.
- [69] Galarreta BC, Tabatabaei M, Guieu V, *et al.* Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(5): 1613–1621.
- [70] AsensioRM, HernándezBJ, Rocco A, *et al.* Food analysis: A continuous challenge for miniaturized separation techniques [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(21): 3764–3800.
- [71] Revermann T, Gotz S, Kunemeyer J, *et al.* Quantitative analysis by microchip capillary electrophoresis-current limitations and problem-solving strategies [J]. *Analyst*, 2008, 133(2): 167–174.
- [72] Guo L, Feng J, Fang Z, *et al.* Application of microfluidic “lab-on-a-chip” for the detection of mycotoxins in foods [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 46(2, Part A): 252–263.
- [73] Ge S, Ge L, Yan M, *et al.* A disposable immunosensor device for point-of-care test of tumor marker based on copper-mediated amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 43: 425–431.
- [74] Fu Z, Shao G, Wang J, *et al.* Microfabricated renewable beads-trapping/releasing flow cell for rapid antigen–antibody reaction in chemiluminescent immunoassay [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(7): 2685–2690.

作者简介



满 燕, 博士, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: many@brcast.org.cn



潘立刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。
E-mail: panlg@brcast.org.cn

《食品掺假与食物中毒专题》征稿函

民以食为天, 保障食品健康安全是政府监管部门的职责, 国家已不断加强了对食品安全的监管力度, 但“暴利之下必有勇夫”, 一些食品经营企业或个体以掺假、掺杂、伪造等手法达到非法牟利目的, 食品安全事故频频出现。另外, 食物中毒是一类经常发生的疾病, 会对人体健康和生命造成严重损害。

鉴于此, 本刊特别策划了“**食品掺假与食物中毒专题**”专题, 由中国检验检疫科学研究院副院长陈颖研究员担任专题主编。专题将围绕**(1)基因组学、代谢组学、脂质组学、蛋白组学等食品组学方法在食品掺伪鉴别中的应用; (2)无损检测在食品掺伪和品质鉴定中的应用; (2)食物掺假的应对策略、食品掺假管理; (3)食物中毒原因筛查、防控相关技术和方法或您认为本领域有意义的问题**展开讨论, 计划在**2017年10月**出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在**2017年9月30日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部